

UNIVERZITA KARLOVA  
Lékařská fakulta v Plzni

# AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

**Vývoj a validace metod pro typizaci bakterií pomocí MALDI-TOF  
hmotnostní spektrometrie**

Development and validation of methods for typing of bacteria by  
MALDI-TOF mass spectrometry

Mgr. Kateřina Chudějová

Plzeň (2018)



Disertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu *Hygiena, preventivní lékařství a epidemiologie* na Ústavu mikrobiologie LF UK v Plzni.

Uchazeč: **Mgr. Kateřina Chudějová**

Školitel: doc. **Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.**

Konzultant: **Dr. Costas C. Papagiannitsis**

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba disertační práce před komisí pro obhajobu disertačních prací studijního programu: *Hygiena, preventivní lékařství a epidemiologie*

se koná dne:

Místo obhajoby:

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

*prof. MUDr. Petr Pazdiora, CSc.*

předseda komise pro obhajobu disertačních prací studijního programu *Hygiena, preventivní lékařství a epidemiologie*

*Ústav epidemiologie Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova*

## Obsah

1	Úvod .....	7
2	Hypotéza .....	8
3	Cíl práce .....	8
4	Validace automatické depozice bakterií a kvasinek na MALDI destičku pro MALDI-TOF MS identifikaci za použití robotu MALDI Colonyst .....	9
5	Charakterizace KPC-kódujícího plasmidu u <i>Enterobacteriaceae</i> izolovaných v české nemocnici.....	11
6	Molekulární charakterizace <i>Enterobacteriaceae</i> produkujících OXA-48-like karbapenemázu a průkaz horizontálního přenosu pOXA-48-like plasmidů .....	13
7	Charakterizace NDM-kódujících plasmidů u <i>Enterobacteriaceae</i> získaných z českých nemocnic .....	15
8	Molekulární charakterizace karbapenemázu produkujících <i>Pseudomonas aeruginosa</i> českého původu, a průkaz klonálního šíření značně rezistentního sekvenčního typu 357 exprimujícího IMP-7 metalo- $\beta$ -laktamázu .....	17
9	Závěr .....	19
10	Curriculum vitae .....	24
11	Seznam publikací .....	27

## Abstrakt

Infekce spojené s nemocniční péčí se ve značně míře podílejí na mortalitě a morbiditě ve zdravotnických zařízeních. Riziko vzniku nozokomiálních infekcí se významně liší u různých skupin pacientů v závislosti na charakteru jejich primárního onemocnění, komorbiditách, poskytované péči, délce hospitalizace a také typu použitých diagnostických a léčebných postupů. Velkou roli mohou také hrát umělé materiály jako jsou centrální žilní katetry, shunty, močové cévky, kloubní a chlopenní náhrady, nebo umělá plicní ventilace. Většina nozokomiálních infekcí je způsobena zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, členy rodů *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., nebo některými grampozitivními bakteriemi, zejména rody *Staphylococcus* spp. a *Enterococcus* spp. Což je především umožněno jejich schopností uchovávat a přenášet různé typy rezistencí k antimikrobním látkám. Identifikace a typizace těchto patogenních organismů je proto nepostradatelným nástrojem moderního sledování infekčních onemocnění v oblasti veřejného zdraví, nejen pro vhodnou a účinnou léčbu infekcí, ale i v případě výskytu epidemických epizod. Pochopení klíčové kontinuity mezi vyšetřovanými kmeny je nezbytné pro určení zdroje a cesty šíření infekcí, potvrzení nebo vyloučení epidemických epizod, sledování zkříženého přenosu patogenů souvisejících se zdravotní péčí, nebo rozpoznání virulentních kmenů. Pro tento účel může být použita řada jednoduchých fenotypových metod, jako je stanovení minimální inhibiční koncentrace, biochemické testování nebo serotypizace, které využívají rozdílů v morfologii, biochemické a enzymatické aktivitě, nebo v antigenním složení jednotlivých mikroorganismů. Kromě toho lze použít komplexnější genotypizační metody k zajištění senzitivnější diferenciací kmenů, vyšší úrovně standardizace, reprodukovatelnosti, typizovatelnosti a diskriminační síly ve srovnání s metodami fenotypizačními. Tyto techniky zahrnují nejen řadu postupů založených na PCR, často spojených s běžnou, pulzní nebo kapilární elektroforézou, ale také sekvenování, a to od sekvenování jednotlivých genů Sangerovou metodou, až po náročnou celogenomovou sekvenaci.

Tato dizertační práce shrnuje výsledky pěti vybraných prací publikovaných v zahraničních časopisech s impaktním faktorem, přičemž dvě publikace jsou prvoautorské. První práce vedla k vývoji a validaci nové automatické techniky pro depozici bakterií a kvasinek na MALDI destičku pomocí „mokrých depozic“ do kapky 70% kyseliny mravenčí. Tato automatická depozice byla porovnávána s běžnou ruční depozicí pomocí dřevěného párátko, semi-extrakcí, běžně používanou při identifikaci kvasinek, a ruční „mokrou depozicí“. Přičemž, použití robota MALDI Colonyer výrazně zvýšilo identifikační skóre bakterií ve srovnání s rutinním diagnostickým procesem. Následující čtyři publikace se zaměřují na epidemiologii několika nejběžněji se vyskytujících karbapenemáz v České republice (KPC, OXA-48, NDM a IMP), a to buď v rámci nemocničních epidemických epizod, nebo v rámci jejich výskytu po celé republice. Konkrétně jsme se zaměřili na detekci možného šíření klonů a sledování cesty a zdroje jejich přenosu, s využitím řady typizačních metod, jak fenotypových, tak genotypových, včetně celogenomové sekvenace.

**Klíčová slova:** typizace bakterií – fenotypizační metody – genotypizační metody – NGS – MALDI-TOF MS – epidemická epizoda – HAI

## Abstract

Healthcare-associated infections represent a significant cause of morbidity and mortality in hospital settings. The risk of nosocomial infection differs significantly in different groups of patients, depending on the character of their primary illness, the co-morbidities, the type of care provided, the length of hospitalization, or the medical procedures used. Artificial surfaces such as central venous catheters, shunts, urinary catheters, valve and joint replacements or controlled lung ventilation play a major role. The majority of nosocomial infections is caused by several representative of *Enterobacteriaceae* family, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., or some Gram-positives, especially *Staphylococcus* and *Enterococcus* spp. This is largely due to their ability to retain and transfer different types of resistance to antibiotics. The identification and subtyping of these pathogenic microorganisms is an essential tool of modern public health infectious disease surveillance not only for appropriate and efficient treatment of infections, but also in case of an outbreak. Understanding clonal continuity among investigated strains is essential to determine the source and routes of infections, confirm or rule out outbreaks, trace cross-transmission of healthcare-associated pathogens, or recognize virulent strains. For this purpose, a series of simple phenotypic methods such as determination of minimal inhibition concentration, biochemical testing or serotyping can be used, utilizing differences in morphology, biochemical and enzymatic activity, or antigenic composition of given microorganism. Furthermore, more complex genotypic methods can be used to provide more sensitive strain differentiation and higher levels of standardization, reproducibility, typeability, and discriminatory power compared with phenotypic typing methods. These techniques include not only the number of PCR-based methods, often associated with conventional, pulsed or capillary electrophoresis, but also sequenation, ranging from Sanger sequencing of individual genes to exacting whole-genome sequencing.

The present dissertation thesis summarizes the results of five selected publications published in impact factor journals, with two first-author publications. The first work led to the development and validation of a novel automatic technique for bacterial and yeast deposition on MALDI target using “wet-deposition” into a droplet of 70% formic acid. This automatic deposition was compared to conventional manual spotting using a wooden toothpick, semi-extraction routinely used for yeasts, and manual “wet-deposition”. Spotting by MALDI Colonyst robot significantly increased identification score of bacteria compared with the routine diagnostic process. Following four publications are focused on the epidemiology of several of the most common carbapenemases in the Czech Republic (KPC, OXA-48, NDM, and IMP), either within hospital outbreaks or their occurring across the country. In particular, we focused on detecting the possible clonal spread and tracking the path and the source of their transmission with the use of a number of typing methods, both phenotypic and genotypic, including whole-genome sequencing.

**Keywords:** bacterial typing – phenotypic methods – genotypic methods – NGS – MALDI-TOF MS – outbreak – HAI

## 1 Úvod

Infekce spojené s nemocniční péčí (Healthcare-Associated Infections, HAI) se ve značné míře podílejí na morbiditě a mortalitě v nemocničních zařízeních. Tyto infekce postihují ve Spojených státech přibližně 2 miliony lidí ročně, což odpovídá asi 5 % hospitalizovaných pacientů. Výsledkem je přibližně 88 000 úmrtí ročně a náklady na zdravotní péči dosahující až hodnoty 4,5 miliardy dolarů.<sup>1</sup> Podobná incidence nozokomiálních infekcí je i v zemích Evropské unie, přičemž v České republice se tyto infekce vyskytují u přibližně 5-7 % hospitalizovaných pacientů a jejich léčba vede k významnému nárůstu vynaložených nákladů.<sup>2</sup> V rozvojových zemích je výskyt nozokomiálních infekcí vyšší než 10 %, což většinou vyplývá z nedostatečné zdravotní péče a nízké úrovně hygieny. Riziko nozokomiálních infekcí se významně liší v různých skupinách pacientů, v závislosti na charakteru primárního onemocnění, komorbiditách, druhu poskytované péče, délce hospitalizace nebo použitých léčebných postupech. Velmi důležitou roli hrají také umělé povrchy, jako jsou centrální žilní katétr, shunt, močové cévky, chlopně a kloubní náhrady, nebo umělá plicní ventilace.<sup>3</sup> Z čehož vyplývají čtyři základní skupiny HAI: (i) infekce krevního oběhu související s centrálním žilním přístupem, (ii) infekce močových cest spojené se zavedenou močovou cévkou, (iii) infekce v místě chirurgického zákroku, a nejpočetnější (iv) pneumonie spojené s umělou ventilací.<sup>4</sup> Epidemické epizody nozokomiálních infekcí jsou neustále hlášeny po celém světě v různých typech zdravotnických zařízení, a to nejen na jednotkách intenzivní péče (JIP), ale také na běžných odděleních.<sup>5</sup> Většina nozokomiálních infekcí bývá způsobena několika zástupci skupiny mikrobů, tzv. ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter species*), které jsou takto nazývány na základě jejich časté multirezistence, která jim dává potenciál uniknout působení různých antimikrobiálních látek.<sup>6</sup> Dle Centra pro kontrolu onemocnění a prevenci (Center for Disease Control and Prevention, CDC) se na vzniku nozokomiálních infekcí mohou často podílet i jiné patogeny, jako např. *Clostridium difficile* (způsobující pseudomembranózní kolitidu spojenou s postantibiotickým účinkem), *Candida* spp., některé viry (převážně viry hepatitid a chřipky), a v některých oblastech také mykobakteria způsobující tuberkulózu. V posledních letech se na vzniku těchto infekcí intenzivně podílely i *Enterobacteriaceae* rezistentní ke karbapenemům (Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*, CRE). CRE si vyvinuly rezistenci prakticky ke všem běžným antibiotikům a jsou často citlivé pouze k antibiotikům poslední volby, jako jsou aminoglykosidy, tigecyklin, fosfomicin nebo kolistin. Ale mohou být rezistentní i vůči nim, proto mohou být infekce způsobené těmito patogeny jen obtížně léčitelné a mohou vést i ke smrti.<sup>7</sup> Rezervoárem patogenů způsobujících nemocniční infekce může být nejen endogenní mikroflóra pacienta, která je do rány přenesena během chirurgického zákroku, ale mohou jim být i jiní pacienti, zaměstnanci, nebo také okolní prostředí.<sup>8</sup>

Identifikace a typizace těchto patogenních mikroorganismů je proto nezbytným nástrojem moderního sledování infekčních onemocnění v oblasti veřejného zdraví, a to nejen pro vhodnou a účinnou léčbu infekcí, ale také v případě výskytu

epidemických epizod.<sup>9, 10</sup> Pochopení klonální kontinuity mezi vyšetřovanými kmeny je nezbytné pro určení zdroje a cesty šíření infekcí, potvrzení nebo vyloučení epidemické epizody, sledování zkříženého přenosu patogenů souvisejících se zdravotní péčí, nebo rozpoznání virulentních kmenů. To významně napomáhá zvýšit efektivitu sledování vzniklých infekcí při kontrole veřejného zdraví a případně zabránit vzniku nových epidemických epizod.<sup>11, 12</sup>

## 2 Hypotéza

- Rozvoj antibiotické rezistence u gramnegativních bakterií a jejich šíření ve zdravotnických zařízeních, kde mohou vyvolávat krátkodobé i dlouhodobé epidemické epizody různého rozsahu, je v posledních letech hlavním problémem většiny zdravotnických zařízení.
- Je proto nezbytné tyto patogeny včas detekovat, správně identifikovat, pochopit vztahy mezi jednotlivými izoláty, a zejména včas zjistit jejich zdroj a způsob šíření.
- V současné době se používá široká škála technik pro typizaci bakterií, které se podstatně liší v závislosti na požadovaném úsilí, ceně, spolehlivosti, a schopnosti rozlišovat mezi jednotlivými bakteriálními kmeny. Přičemž žádná technika není optimální pro všechny typy epidemiologických studií.
- Proto je výběr typizační techniky klíčový pro úspěšné porozumění patogenezí a přenosu infekcí, a případnou prevenci onemocnění.

## 3 Cíl práce

- Vývoj a validace standardizované metody pro automatickou depozici izolátů bakterií a kvasinek na MALDI destičku.
- Epidemiologické studie několika epidemických epizod v českých nemocnicích, způsobených enterobakteriemi a pseudomonádami produkujícími karbapenemázu za využití široké škály bakteriálních typizačních metod, od základních fenotypových postupů až po celogenomovou sekvenaci.

#### 4 Validace automatické depozice bakterií a kvasinek na MALDI destičku pro MALDI-TOF MS identifikaci za použití robotu MALDI Colonyst

**Kateřina Chudějová<sup>1,3</sup>, Michal Boháč<sup>2</sup>, Anna Skálová<sup>1,3</sup>, Veronika Rotová<sup>1</sup>, Costas C. Papagiannitsis<sup>1</sup>, Jana Hanzlíčková<sup>3</sup>, Tamara Bergerová<sup>1,3</sup> and Jaroslav Hrabák<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> *Biomedicínské centrum a Oddělení mikrobiologie, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Plzeň, Univerzita Karlova, Plzeň, Česká republika*

<sup>2</sup> *Bruker s.r.o., Pražákova 60, Brno, Česká republika*

<sup>3</sup> *Oddělení mikrobiologie, Fakultní nemocnice Plzeň, Česká republika*

**Publikace:** PLoS ONE 12(12): e0190038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190038>

Hlavním cílem klinické mikrobiologie je izolace a identifikace patogenních mikroorganismů a následné stanovení jejich citlivosti k antimikrobiálním látkám pro předepsání adekvátní léčby daného onemocnění. Identifikace bakterií a hub založená na hmotnostní spektrometrii s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátořem (MALDI-TOF MS) signifikantně změnila diagnostický proces v oboru klinické mikrobiologie.

V rámci této studie jsme popsali inovativní techniku pro depozici bakterií a kvasinek na MALDI destičku za použití automatizovaného pracovního postupu, který zvyšuje získané identifikační skóre. V první fázi studie byly srovnávány čtyři různé techniky nanášení vzorků na destičku. Na MALDI destičku bylo naneseno 100 gramnegativních, 100 grampozitivních a 20 anaerobních bakterií, a 20 kvasinek pomocí klasické manuální depozice za využití dřevěného párátko, která byla srovnávána se semi-extrakcí, vlhkou depozicí do kapky 70% kyseliny mravenčí, a automatickou depozicí využívající právě robot MALDI Colonyst. Přičemž nejnižšího skóre bylo dosaženo klasickou ruční depozicí, která se významně lišila od ostatních tří technik. Identifikační skóre semiextrakce, vlhké depozice a automatické vlhké depozice se při výpočtu relativní směrodatné odchylky (RSD) významně nelišily. Nicméně nejlepší výsledky s nízkou mírou chybovosti byly získány při využití robota MALDI Colonyst. Druhý krok validace zahrnoval zpracování 542 klinických izolátů v rutinní mikrobiologické laboratoři pomocí běžně využívané ruční depozice párátkem nebo semiextrakce kyselinou mravenčí (v případě kvasinek), a automatické depozice za využití MALDI Colonyst robotu. Validace v rutinním provozu ukázala signifikantně vyšší skóre u automatického zpracování ve srovnání se standardními manuálními metodami u všech testovaných skupin mikroorganismů (grampozitivní, gramnegativní a anaerobní bakterie, a kvasinky).

Automatická depozice je rychlá a dobře monitorovaná technika, která umožňuje zpracovat 96 pozic MALDI destičky přibližně za 45 minut se standardizovaným množstvím biomasy na každém spotu, což umožňuje retrospektivní kontrolu kvality. Navíc nevyžaduje pipetovací špičky pro nanášení kyseliny mravenčí, což snižuje spotřební náklady. Nevýhodou může být vysoká pořizovací cena, kterou si nemohou dovolit menší laboratoře s malým obratem identifikovaných vzorků za den. A jak ukazují naše data, automatická depozice kolonií na MALDI destičku vede ke zvýšení MALDI-TOF MS identifikačního skóre a reprodukovatelnosti.

## 5 Charakterizace KPC-kódujícího plasmidu u *Enterobacteriaceae* izolovaných v české nemocnici

Rudolf Kukla,<sup>1†</sup> Kateřina Chudějová,<sup>2,3†</sup> Costas C. Papagiannitsis,<sup>1,2,3</sup> Matěj Medvecký,<sup>4,5</sup> Kateřina Habalová,<sup>1</sup> Lenka Hobzová,<sup>6</sup> Radka Bolehovská,<sup>7</sup> Lenka Plíšková,<sup>7</sup> Jaroslav Hrabák,<sup>2,3</sup> Helena Žemličková,<sup>1,8</sup>

<sup>1</sup> Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Česká republika

<sup>2</sup> Oddělení mikrobiologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Česká republika

<sup>3</sup> Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Česká republika

<sup>4</sup> Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno, Česká republika

<sup>5</sup> National Centre for Biomolecular Research, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Brno, Česká republika

<sup>6</sup> Ústav hygieny a preventivního lékařství, Fakultní nemocnice, Hradec Králové, Česká republika

<sup>7</sup> Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice, Hradec Králové, Česká republika

<sup>8</sup> Národní referenční laboratoř pro antibiotika, Státní zdravotní ústav, Praha, Česká republika

†Rudolf Kukla a Kateřina Chudějová v této práci přispěli stejným dílem.

**Publikace:** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 62: e02152-17.

<https://doi.org/10.1128/AAC.02152-17>

$\beta$ -laktamáza typu KPC představuje výraznou skupinu plasmidem přenášených enzymů s karbapenemázovou aktivitou, vyskytující se převážně u kmenů *Klebsiella pneumoniae*. Se jedná o patogeny, které způsobují infekce spojené se zdravotní péčí, zejména díky své rozsáhlé rezistenci k různým antibiotikům a jejich schopnosti vyvolávat infekce spojené s vysokou mírou úmrtnosti.<sup>13</sup> Producenti KPC jsou celosvětově rozšířeni a v současné době představují významný problém pro veřejné zdraví.<sup>14</sup> Přesto byl jejich výskyt v České republice doposud pouze sporadický. Prvním případem u nás byla *Klebsiella pneumoniae* produkující KPC-2 nalezena v roce 2009 u pacienta, který byl dříve hospitalizován v Řecku.<sup>15</sup>

Tato studie monitoruje epidemickou epizodu KPC produkujících enterobakterií, která byla zaznamenána na 3. Interní gerontometabolické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Od roku 2014 do roku 2016 bylo detekováno deset jedinečných izolátů produkujících KPC získaných od sedmi pacientů. Zajímavé je, že žádný z těchto pacientů neměl cestovní anamnézu. Všechny deset izolátů bylo pozitivní na přítomnost genu *bla<sub>KPC-2</sub>*. Většinu izolátů tvořily kmeny *Citrobacter freundii* náležící do tří sekvenčních typů (ST), přičemž převažoval ST18. U jednoho z pacientů byly během hospitalizace zachyceny čtyři různé izoláty produkující KPC-2 (*C. freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, a *Morganella morganii*), což potvrzuje hypotézu *in vivo* horizontálního přenosu plasmidu nesooucího gen *bla<sub>KPC-2</sub>*. Stejný typ plasmidu byl také nalezen u dvou izolátů jiných pacientů, což dále podporuje tuto hypotézu. U všech deseti izolátů nesooucí gen *bla<sub>KPC-2</sub>* byly identifikovány plasmidy tří různých velikostí (~30, ~45 a ~80 kb), z nichž osm bylo IncR pozitivní. Poté celogenomová sekvenace (WGS) odhalila také tři typy plasmidů, které byly označeny A, B a C. Přičemž převažovaly plasmidy typu A odpovídající velikosti plasmidu ~45 kb, u kterých se IncR alela a gen pro KPC-2 nacházely v oblasti kódující multirezistence. Plasmid typu B byl derivátem plasmidu typu A, a nesl segment odvozený od IncN3 alely, zatímco plasmid typu C obsahoval alelu IncP6. Přičemž oba plasmidy sdílely s plasmidem A stejnou multirezistentní oblast. Ani jeden z plasmidů nebyl konjugativní kvůli částečné deleci nebo nepřítomnosti genů, které umožňují transport. U všech plasmidů byl gen *bla<sub>KPC-2</sub>* kódován na transposonu Tn<sub>4401a</sub>, což je derivát Tn<sub>4401</sub> běžně se vyskytujícího u KPC producentů.

Naše nálezy zdůrazňují rostoucí klinický význam plasmidů typu IncR a potenciální možnost šíření jednotlivých genů rezistence v rámci velkých MDR segmentů přestavbou enterobakteriálních plasmidů.

## 6 Molekulární charakterizace *Enterobacteriaceae* produkujících OXA-48-like karbapenemázu a průkaz horizontálního přenosu pOXA-48-like plasmidů

Anna Skálová,<sup>1,2</sup> Kateřina Chudějová,<sup>1,2</sup> Veronika Rotová,<sup>1,2</sup> Matěj Medvecký,<sup>3</sup> Vendula Študentová,<sup>1,2</sup> Eva Chudáčková,<sup>1,2</sup> Pavel Lavička,<sup>4</sup> Tamara Bergerová,<sup>1,2</sup> Vladislav Jakubu,<sup>2,5</sup> Helena Žemličková,<sup>2,5,6</sup> Costas C. Papagiannitsis,<sup>1,2</sup> and Jaroslav Hrabák<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Oddělení mikrobiologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Česká republika

<sup>2</sup> Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Česká republika

<sup>3</sup> Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno, Česká republika

<sup>4</sup> Oddělení neurochirurgie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Česká republika

<sup>5</sup> Národní referenční laboratoř pro antibiotika, Státní zdravotní ústav, Praha, Česká republika

<sup>6</sup> Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Česká republika

**Publikace:** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 61: eoi889-16.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.01889-16>

Karbapenemáza OXA-48, která náleží do  $\beta$ -laktamáz skupiny D, vykazuje slabou, ale významnou karbapenemázovou aktivitu. Poprvé byla popsána u bakterií *Klebsiella pneumoniae* v Turecku v roce 2003.<sup>16</sup> Ve stejném období byl gen *bla*<sub>OXA-48</sub> identifikován také v jiných zemích Středního východu a severní Afriky, v Evropě byl detekován pouze sporadicky.<sup>17, 18</sup> Ale v současné době se producenti OXA-48 rozšiřují po celé Evropě s největším výskytem zejména v oblasti jihovýchodní Evropy.<sup>19</sup> Přesto byla u nás OXA-48 doposud zaznamenávána pouze sporadicky. Jelikož producenti karbapenemázy OXA-48 vykazují pouze nízkou úroveň rezistence ke karbapenemům a nedají se odlišit fenotypovými testy za využití inhibitorů, může být jejich identifikace poměrně obtížná.

Cílem této studie bylo charakterizovat první případy epidemických epizod *Enterobacteriaceae* produkujících karbapenemázu OXA-48 získaných z nemocničních zařízení celé České republiky. Za období 2013-2015 bylo izolováno 22 izolátů *Klebsiella pneumoniae*, 3 *Escherichia coli*, a 1 izolát *Enterobacter cloacae* pocházejících od 20 pacientů. Všechny tyto izoláty produkovaly OXA-48-like karbapenemázu. Přičemž čtyři pacienti byli kolonizováni nebo infikováni dvěma nebo třemi různými

producenty OXA-48-like. Izoláty *K. pneumoniae* byly tvořeny devíti sekvenčními typy (ST), kdy převládal ST101 (n = 8). Tento sekvenční typ je celosvětově spojován s epidemickými epizodami způsobenými *K. pneumoniae* producenty OXA-48.<sup>20-23</sup> U izolátů *E. coli* byly zastoupeny různé ST, a izolát *E. cloacae* patřil k ST109. Dvacet čtyři izolátů neslo gen *bla*<sub>OXA-48</sub>, zatímco dva zbylé izoláty nesly geny *bla*<sub>OXA-181</sub> nebo *bla*<sub>OXA-232</sub>. Téměř všechny izoláty (n = 22) nesoucí *bla*<sub>OXA-48</sub> obsahovaly plasmidy podobné velikosti (~60 kb), s výjimkou dvou izolátů produkujících OXA-181 nebo OXA-232. S<sub>1</sub> profilování velikosti plasmidů spojené s hybridizací odhalilo chromozomální umístění genu *bla*<sub>OXA-48</sub> u izolátu *K. pneumoniae* ST45 a izolátu *E. coli* ST38. Následné celogenomové sekvenování ukázalo, že většina plasmidů nesoucích gen *bla*<sub>OXA-48</sub> vykazuje vysoký stupeň podobnosti s pOXA-48-like plasmidem pE71T, který byl dříve popsán v Irsku.<sup>24</sup> Dále byly identifikovány dva nové deriváty plasmidu pE71T, a to pOXA-48\_30715 a pOXA-48\_30891. Plasmid nesoucí *bla*<sub>OXA-181</sub> byl identický s plasmidem IncX3 pOXA181\_EC14828, zatímco plasmid nesoucí *bla*<sub>OXA-232</sub> byl plasmidem typu ColE2, což je nový derivát pOXA-232. Sekvenční data také ukázala, že izoláty *K. pneumoniae* ST45 a *E. coli* ST38 obsahovaly chromozomálně lokalizovaný transpozon Tn6237 nesoucí gen *bla*<sub>OXA-48</sub>.

Tyto poznatky potvrzují skutečnost, že horizontální přenos plasmidů pOXA-48-like hraje významnou roli při šíření genů *bla*<sub>OXA-48</sub> v České republice. Přičemž v kombinaci s jejich obtížnou detekcí představují producenti karbapenemáz OXA-48 významnou hrozbu pro veřejné zdraví.

## 7 Charakterizace NDM-kódujících plasmidů u *Enterobacteriaceae* získaných z českých nemocnic

Veronika Pašková,<sup>1,2</sup> Matěj Medvecký,<sup>3,4</sup> Anna Skálová,<sup>1,2</sup> Kateřina Chudějová,<sup>1,2</sup> Ibrahim Bitar,<sup>1,2</sup> Vladislav Jakubů,<sup>5</sup> Tamara Bergerová,<sup>1,2</sup> Helena Žemličková,<sup>5,6</sup> Costas C. Papagiannitsis,<sup>1,2</sup> and Jaroslav Hrabák,<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Oddělení mikrobiologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Česká republika

<sup>2</sup> Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Česká republika

<sup>3</sup> Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno, Česká republika

<sup>4</sup> National Centre for Biomolecular Research, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Brno, Česká republika

<sup>5</sup> Národní referenční laboratoř pro antibiotika, Státní zdravotní ústav, Praha, Česká republika

<sup>6</sup> Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Česká republika

### v tisku

Metalo  $\beta$ -laktamáza typu NDM byla poprvé popsána u *K. pneumoniae* a *E. coli* izolovaných ve Švédsku v roce 2008 od indického pacienta s předchozí hospitalizací v Novém Dillí.<sup>25</sup> Od té doby jsou bakterie produkující NDM popisovány celosvětově u klinických izolátů *Enterobacteriaceae* a *Acinetobacter baumannii*. V České republice byl výskyt NDM producentů pouze sporadický, v období 2011 až 2013 byly u nás popsány pouze tři případy.<sup>26-28</sup>

Tato studie je zaměřena na sporadické případy a epidemické epizody *Enterobacteriaceae* produkujících NDM-like karbapenemázu, které byly získány od pacientů českých nemocnic během roku 2016. V tomto období bylo zachyceno 18 izolátů enterobakterií produkujících NDM karbapenemázu získaných od 15 pacientů. Tento soubor obsahoval 10 izolátů komplexu *Enterobacter cloacae*, 4 izoláty *E. coli*, 1 izolát *Kluyvera intermedia*, 1 *K. pneumoniae*, 1 *Klebsiella oxytoca* a 1 *Raoultella ornithinolytica*. Přičemž u tří pacientů byli při hospitalizaci detekováni dva různí NDM-like producenti, což podporuje hypotézu *in vivo* horizontálního přenosu plasmidu nesoucího gen *bla<sub>NDM</sub>*. Postupně byly všechny izoláty podrobeny multilokusové sekvenaci (MLST), profilování plasmidů za použití S1 endonukleázy, a celogenomovému sekvenování (Illumina, San Diego CA, USA). Následně byla provedena komparativní analýza klinických izolátů komplexu *E. cloacae* založená na detekci jednonukleotidových polymorfismů (Single-Nucleotide Polymorphisms,

SNPs). Všechny izoláty komplexu *E. cloacae*, s výjimkou *E. asburiae*, které byly získány ze stejné nemocnice, patřily k sekvenčnímu typu (ST) 182. Dále dva izoláty *E. coli* náležely k ST167, zatímco zbývající izoláty nebyly klonálně příbuzné. Třináct izolátů obsahovalo gen *bla*<sub>NDM-4</sub>, zatímco zbylých šest izolátů neslo gen *bla*<sub>NDM-1</sub> nebo *bla*<sub>NDM-5</sub>. Téměř všechny izoláty obsahovaly plasmid nesoucí gen *bla*<sub>NDM</sub>, který byl pozitivní pro alelu IncX3, pouze s výjimkou izolátů *E. coli* ST58 a *K. pneumoniae* ST14 produkujících karbapenemázu NDM-1. Sekvenční analýza plasmidů ukázala, že všechny IncX3 plasmidy vykazovaly vysokou vzájemnou podobnost a také podobnost k dříve popsaným plasmidům hlášeným po celém světě.<sup>29-31</sup> Pro srovnání Bocanegra-Ibarias *et al.*<sup>32</sup> použil u podobné epidemické epizody pouze plasmidovou analýzu s použitím S1 endonukleázy a poté soubor podrobil MLST pro detekci klonální diverzity. Podobná typizační schéma využil i Torres-Gonzalez *et al.*<sup>33</sup> pro vyšetření epidemické epizody v Mexiku, s tím rozdílem, že analyzovali celý chromozom naštěpený restriční endonukleázou XbaI. V obou těchto případech bylo identifikováno množství izolátů *E. cloacae* ST182, stejně jako v našem případě.

Na základě těchto a dalších publikací je zřejmé, že *Enterobacter cloacae* ST182 hraje důležitou roli v globálním šíření genu *bla*<sub>NDM</sub>. A v kombinaci s dalším vývojem plasmidů umožňující přestavbu multirezistentních oblastí nesoucích geny *bla*<sub>NDM-like</sub> u enterobakterií může jít o významnou epidemiologickou hrozbu.

## 8 Molekulární charakterizace karbapenemázu produkujících *Pseudomonas aeruginosa* českého původu, a průkaz klonálního šíření značně rezistentního sekvenčního typu 357 exprimujícího IMP-7 metalo- $\beta$ -laktamázu

Costas C. Papagiannitsis,<sup>1,2</sup> Matěj Medvecký,<sup>3</sup> Kateřina Chudějová,<sup>1,2</sup> Anna Skálová,<sup>1,2</sup> Veronika Rotová,<sup>1,2</sup> Petra Španělová,<sup>4</sup> Vladislav Jakubů,<sup>2,4</sup> Helena Žemličková,<sup>2,4,5</sup> and Jaroslav Hrabák,<sup>1,2</sup> jménem českých účastníků Evropské sítě pro sledování antimikrobiální rezistence (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, EARS-Net*)

<sup>1</sup> Oddělení mikrobiologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Česká republika

<sup>2</sup> Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Česká republika

<sup>3</sup> Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno, Česká republika

<sup>4</sup> Národní referenční laboratoř pro antibiotika, Státní zdravotní ústav, Praha, Česká republika

<sup>5</sup> Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Česká republika

**Publikace:** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 61: eoi811-17.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.01811-17>.

*Pseudomonas aeruginosa* je jedním z klinicky nejdůležitějších oportunních patogenů, který se vyznačuje vrozenou rezistencí k široké škále antimikrobních látek.<sup>34</sup> Ojedinele jsou popisovány pseudomonády produkující serinové proteázy jako jsou KPC, OXA nebo GES, ale mnohem častěji jsou spojovány s produkcí metalo- $\beta$ -laktamáz (M $\beta$ L), zejména typů VIM a IMP.<sup>35</sup> M $\beta$ L jsou zinek-dependentní enzymy obecně charakteristické schopností hydrolyzovat většinu  $\beta$ -laktamů a to včetně karbapenemů. Tyto enzymy byly v České republice popisovány spíše sporadicky.

V tomto případě se jedná o první národní studii izolátů *P. aeruginosa* produkujících karbapenemázu za použití podrobné molekulárně-genetické typizace. Během roku 2015 bylo shromážděno 136 izolátů karbapenemázu produkujících pseudomonád pocházejících z 22 nemocnic celé republiky. Sto třicet dva izolátů produkovalo karbapenemázu typu M $\beta$ L a zbývající čtyři izoláty produkovaly karbapenemázu GES třídy A. Naprostá většina pseudomonád produkujících M $\beta$ L náležela k sekvenčnímu typu (ST) 357 a nesla integron In-p110 kódující M $\beta$ L typu IMP-7, což poukazuje na klonální šíření těchto izolátů v českých nemocnicích. Mimo jiné byly zaznamenány i ST111 a 235, které jsou považovány za vysoce rizikové klony.<sup>36</sup> Všechny izoláty byly

podrobeny PCR mapování oblastí obklopujících karbapenemázu kódujících genů, které odhalilo sedm typů integronů třídy 1. Následně bylo provedeno celogenomové sekvenování (WGS) a fylogenetická analýza pro stanovení populační diverzity založená na rozdílech v jednonukleotidových polymorfismech (Single-Nucleotide Polymorphisms, SNPs). Fylogenetická analýza ukázala, že všechny izoláty ST357 vytvořily monofyletickou skupinu, což naznačuje, že tyto izoláty jsou blíže příbuzné. Tato zjištění podpořily hypotézu klonálního šíření izolátů ST357 produkující IMP-7 v českých nemocnicích. WGS také odhalila další geny pro rezistenci, jmenovitě na aminoglykosidy, tetracykliny, trimetoprim a chloramfenikol. Tento výsledek odpovídá závěrům předchozích studií českých a polských izolátů. Většina z těchto multirezistentních izolátů také náležela k ST357, který produkuje IMP-7, ale v tomto případě, byly izoláty porovnány pouze pulzní gelovou elektroforezou.<sup>37</sup> Fylogenetická analýza za použití WGS byla provedena týmem Miyoshi-Akiyama. Přičemž jejich soubor zahrnoval kmeny nemocničních pacientů z období 2001 až 2013, a to nejen z celého Japonska, ale také jiných zemí, mimo jiné z Polska. V tomto případě byl dominantní vysoce rizikový klon ST235, následovaný právě ST357.<sup>38</sup>

Tyto výsledky naznačují, že je pravděpodobné, že se jedná o regionální klonální šíření ST357 produkujícího metalo- $\beta$ -laktamázu typu IMP-7 ve střední Evropě, protože jinde je popisován pouze zřídka. Z těchto důvodů by měla být zavedena vhodná preventivní opatření, která by zabránila dalšímu šíření.

## 9 Závěr

Tato dizertační práce shrnuje výsledky pěti vybraných publikací. První práce vedla k vývoji a validaci nové automatické techniky pro depozici bakterií a kvasinek na MALDI destičku pomocí vlhké depozice do kapičky 70% kyseliny mravenčí. Tato automatická depozice byla porovnáвана s konvenčním ručním nanášením vzorku za použití dřevěného párátko, dále semiextrakcí běžně používanou pro kvasinky a manuálním vlhkým nanášením. Nanášení kolonií pomocí robota MALDI Colonyst výrazně zvýšilo identifikační skóre bakterií ve srovnání s rutinně používanou metodou. Největší rozdíly v identifikačním skóre byly pozorovány u kvasinek a anaerobních bakterií, naopak nejmenší rozdíly u *Enterobacteriaceae*. Jak ukázala naše data, jedná se o robustní metodu, která umožňuje rychlou identifikaci bakterií a kvasinek, což má za následek nejen zvýšení skóre MALDI-TOF MS identifikace, ale také reprodukovatelnosti, a zároveň umožňuje další využití v automatizovaných linkách v laboratořích klinické mikrobiologie.

Následující čtyři publikace se zaměřují na epidemiologii několika nejběžněji se vyskytujících karbapenemáz v České republice (KPC, OXA-48, NDM a IMP), a to buď v rámci nemocničních epidemických epizod, nebo v rámci jejich výskytu po celé republice. Zejména jsme se zaměřovali na jejich možné klonální šíření, a sledování cesty a zdroje jejich přenosu. U karbapenemáz typu KPC-2 byl identifikován převážně nekongugativní plasmid typu IncR, který v této oblasti není popisován, ale je často spojován s šířením karbapenemáz v jihovýchodní Asii.<sup>39, 40</sup> Všechny plasmidy nesly gen *bla*<sub>KPC-2</sub> zabudovaný do transposonu Tn<sub>4401a</sub> v oblasti pro multirezistenci (MDR). Naše nálezy zdůrazňují rostoucí klinický význam IncR plasmidů a potenciální možnost šíření jednotlivých genů rezistence v rámci velkých MDR segmentů přestavbou enterobakteriálních plasmidů.

V případě producentů karbapenemáz typu OXA-48 bylo získáno 26 izolátů *Enterobacteriaceae* od dvaceti pacientů českých nemocnic. V převážné většině se jednalo o izoláty *Klebsiella pneumoniae* s převládajícím ST<sub>101</sub> a ST<sub>461</sub>, ale byly také identifikovány epidemiologicky rizikové klony ST<sub>11</sub>. Obecně byl u většiny izolátů detekován plasmid stejného typu (IncL/M, pE71T) nesoucí gen *bla*<sub>OXA-48-like</sub>. Tento plasmid se geneticky shodoval s plasmidem, který byl poprvé identifikován v roce 2011 v Irsku.<sup>24</sup> Tato zjištění podporují hypotézu horizontálního přenosu pOXA-48-like plasmidu, který umožnil šíření genu *bla*<sub>OXA-48</sub> v nemocnicích v České republice.

V rámci epidemiologické studie producentů metalo-β-laktamáz typu NDM-4 bylo získáno osmnáct izolátů *Enterobacteriaceae* od 15 českých pacientů s převahou izolátů *Enterobacter cloacae* ST<sub>182</sub>. Většina izolátů obsahovala NDM pozitivní plasmid typu IncX<sub>3</sub> jehož analýza ukázala, že všechny tyto plasmidy vykazovaly vysokou podobnost nejen mezi sebou, ale i s dříve popsány plasmidy, hlášenými po celém světě, často právě v souvislosti s ST<sub>182</sub>.<sup>29-31</sup> Na základě těchto a dalších publikací je zřejmé, že *Enterobacter cloacae* ST<sub>182</sub> hraje důležitou roli v globálním šíření genů *bla*<sub>NDM-like</sub>.

V poslední zahrnuté studii jsme se zaměřili na izoláty *P. aeruginosa* produkující metalo-β-laktamáz, zejména typu IMP a VIM. Během roku 2015 bylo ve 22 českých

nemocnicích detekováno 136 metalo- $\beta$ -laktamázu produkujících pseudomonád. Převážná většina těchto izolátů náležela k ST<sub>357</sub> a nesla integron In-p<sub>uo</sub> kódující metalo- $\beta$ -laktamázu typu IMP-7, což naznačuje klonální šíření těchto izolátů v českých nemocnicích. Proto by měla být zavedena vhodná preventivní opatření, která by zabránila dalšímu šíření.

Předchozí závěry potvrzují význam epidemiologických studií jednotlivých genů rezistence sledujících jejich celosvětové šíření, ruku v ruce s vývojem nových výkonných typizačních technik a mezinárodních online databází umožňujících srovnávání.

## Použitá literatura

1. Andrei, A.; Zervos, M. J., The application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* **2006**, *130* (5), 662-668.
2. Státní zdravotní ústav (SZÚ). *Závěry kulatého stolu ke koncepci národní surveillance infekcí spojených se zdravotní péčí v České republice*; 2013.
3. O'Neill, J. The review on antimicrobial resistance - Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations 2016. [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf).
4. CDC. Healthcare-associated infections. <https://www.cdc.gov/hai/index.html>.
5. Tenover, F. C.; Arbeit, R. D.; Goering, R. V.; Murray, B. E.; Persing, D. H.; Pfaller, M. A.; Weinstein, R. A., How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **1997**, *18* (6), 426-439.
6. Váradi, L.; Luo, J. L.; Hibbs, D. E.; Perry, J. D.; Anderson, R. J.; Orensa, S.; Groundwater, P. W., Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: Past, present, and future. *Chemical Society Reviews* **2017**, *46* (16), 4818-4832.
7. CDC. Diseases and organisms in healthcare settings. <https://www.cdc.gov/hai/organisms/organisms.html>.
8. Khan, H. A.; Baig, F. K.; Mehboob, R., Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2017**, *7* (5), 478-482.
9. MacCannell, D., Bacterial Strain Typing. *Clinics in Laboratory Medicine* **2013**, *33* (3), 629-+.
10. Biswas, S.; Rolain, J.-M., Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *Journal of Microbiological Methods* **2013**, *92* (1), 14-24.
11. Ranjbar, R.; Karami, A.; Farshad, S.; Giammanco, G. M.; Mammina, C., Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *New Microbiologica* **2014**, *37* (1), 1-15.
12. Castro-Escarpulli, G.; Alonso-Aguilar, N. M.; Rivera Sánchez, G.; Bocanegra-García, V.; Guo, X.; Juárez-Enríquez, S. R.; Luna-Herrera, J.; Martínez, C. M.; Ma; Guadalupe, A.-A. Identification and Typing Methods for the Study of Bacterial Infections: a Brief Review and Mycobacterial as Case of Study *Archives of Clinical Microbiology* [Online], 2016.
13. Grundmann, H.; Livermore, D. M.; Giske, C. G.; Canton, R.; Rossolini, G. M.; Campos, J.; Vatopoulos, A.; Gniadkowski, M.; Toth, A.; Pfeifer, Y.; Jarlier, V.; Carmeli, Y.; Grp, C. W., Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Eurosurveillance* **2010**, *15* (46), 22-34.
14. Tumbarello, M.; Trearichi, E. M.; De Rosa, F. G.; Giannella, M.; Giacobbe, D. R.; Bassetti, M.; Losito, A. R.; Bartoletti, M.; Del Bono, V.; Corcione, S.; Maiuro, G.; Tedeschi, S.; Celani, L.; Cardellino, C. S.; Spanu, T.; Marchese, A.; Ambretti, S.; Cauda, R.; Viscoli, C.; Viale, P.; Isgri, S., Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2015**, *70* (7), 2133-2143.
15. Hrabak, J.; Niemczykova, J.; Chudackova, E.; Fridrichova, M.; Studentova, V.; Cervena, D.; Urbaskova, P.; Zemlickova, H., KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Czech patient previously hospitalized in Greece and in vivo selection of colistin resistance. *Folia Microbiologica* **2011**, *56* (4), 361-365.

16. Poirel, L.; Heritier, C.; Tolun, V.; Nordmann, P., Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**, *48* (1), 15-22.
17. Carrer, A.; Poirel, L.; Yilmaz, M.; Akan, O. A.; Feriha, C.; Cuzon, G.; Matar, G.; Honderlick, P.; Nordmann, P., Spread of OXA-48-Encoding Plasmid in Turkey and Beyond. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2010**, *54* (3), 1369-1373.
18. Poirel, L.; Potron, A.; Nordmann, P., OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2012**, *67* (7), 1597-1606.
19. Nordmann, P.; Naas, T.; Poirel, L., Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases* **2011**, *17* (10), 1791-1798.
20. Cubero, M.; Cuervo, G.; Dominguez, M. A.; Tubau, F.; Mart, S.; Sevillano, E.; Gallego, L.; Ayats, J.; Pena, C.; Pujol, M.; Linares, J.; Ardanuy, C., Carbapenem-resistant and carbapenem-susceptible isogenic isolates of *Klebsiella pneumoniae* ST101 causing infection in a tertiary hospital. *Bmc Microbiology* **2015**, *15*.
21. Kocsis, E.; Savio, C.; Piccoli, M.; Cornaglia, G.; Mazzariol, A., *Klebsiella pneumoniae* harbouring OXA-48 carbapenemase in a Libyan refugee in Italy. *Clinical Microbiology and Infection* **2013**, *19* (9), E409-E411.
22. Loucif, L.; Kassah-Laouar, A.; Saidi, M.; Messala, A.; Chelaghma, W.; Rolain, J.-M., Outbreak of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* Involving a Sequence Type 101 Clone in Batna University Hospital, Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2016**, *60* (12), 7494-7497.
23. Hashimoto, A.; Nagamatsu, M.; Ohmagari, N.; Hayakawa, K.; Kato, Y.; Kirikae, T., Isolation of OXA-48 Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST101 from an Overseas Traveler Returning to Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **2014**, *67* (2), 120-121.
24. Power, K.; Wang, J.; Karczmarczyk, M.; Crowley, B.; Cotter, M.; Haughton, P.; Lynch, M.; Schaffer, K.; Fanning, S., Molecular Analysis of OXA-48-Carrying Conjugative IncL/M-Like Plasmids in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Ireland. *Microbial Drug Resistance* **2014**, *20* (4), 270-274.
25. Yong, D.; Toleman, M. A.; Giske, C. G.; Cho, H. S.; Sundman, K.; Lee, K.; Walsh, T. R., Characterization of a New Metallo-beta-Lactamase Gene, bla(NDM-1), and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2009**, *53* (12), 5046-5054.
26. Hrabak, J.; Stolbova, M.; Studentova, V.; Fridrichova, M.; Chudackova, E.; Zemlickova, H., NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient repatriated to the Czech Republic from Egypt, July 2011. *Eurosurveillance* **2012**, *17* (7), 9-11.
27. Papagiannitsis, C. C.; Studentova, V.; Chudackova, E.; Bergerova, T.; Hrabak, J.; Radej, J.; Novak, I., Identification of a New Delhi metallo-beta-lactamase-4 (NDM-4)-producing *Enterobacter cloacae* from a Czech patient previously hospitalized in Sri Lanka. *Folia Microbiologica* **2013**, *58* (6), 547-549.
28. Studentova, V.; Dobiasova, H.; Hedlova, D.; Dolejska, M.; Papagiannitsis, C. C.; Hrabak, J., Complete Nucleotide Sequences of Two NDM-1-Encoding Plasmids from the Same Sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* Strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**, *59* (2), 1325-1328.

29. Zhu, Y.-q.; Zhao, J.-y.; Xu, C.; Zhao, H.; Jia, N.; Li, Y.-n., Identification of an NDM-5-producing *Escherichia coli* Sequence Type 167 in a Neonatal Patient in China. *Scientific Reports* **2016**, *6*.
30. Krishnaraju, M.; Kamatchi, C.; Jha, A. K.; Devasena, N.; Vennila, R.; Sumathi, G.; Vaidyanathan, R., Complete sequencing of an IncX3 plasmid carrying bla(NDM-5) allele reveals an early stage in the dissemination of the bla(NDM) gene. *Indian Journal of Medical Microbiology* **2015**, *33* (1), 30-38.
31. Pal, T.; Ghazawi, A.; Darwish, D.; Villa, L.; Carattoli, A.; Hashmey, R.; Aldeesi, Z.; Jamal, W.; Rotimi, V.; Al-Jardani, A.; Al-Abri, S. S.; Sonnevend, A., Characterization of NDM-7 Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolates in the Arabian Peninsula. *Microbial Drug Resistance* **2017**, *23* (7), 871-878.
32. Bocanegra-Ibarias, P.; Garza-Gonzalez, E.; Morfin-Otero, R.; Barrios, H.; Villarreal-Trevino, L.; Rodriguez-Noriega, E.; Garza-Ramos, U.; Petersen-Morfin, S.; Silva-Sanchez, J., Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying Enterobacteriaceae in Mexico. *Plos One* **2017**, *12* (6).
33. Torres-Gonzalez, P.; Bobadilla-del Valle, M.; Tovar-Calderon, E.; Leal-Vega, F.; Hernandez-Cruz, A.; Martinez-Gamboa, A.; Dolores Niembro-Ortega, M.; Sifuentes-Osornio, J.; Ponce-de-Leon, A., Outbreak Caused by Enterobacteriaceae Harboring NDM-1 Metallo-beta-Lactamase Carried in an IncFII Plasmid in a Tertiary Care Hospital in Mexico City. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**, *59* (11), 7080-7083.
34. Driscoll, J. A.; Brody, S. L.; Kollef, M. H., The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* **2007**, *67* (3), 351-368.
35. Cornaglia, G.; Giamarellou, H.; Rossolini, G. M., Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infectious Diseases* **2011**, *11* (5), 381-393.
36. Woodford, N.; Turton, J. F.; Livermore, D. M., Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *Fems Microbiology Reviews* **2011**, *35* (5), 736-755.
37. Hrabak, J.; Cervena, D.; Izdebski, R.; Duljasz, W.; Gniadkowski, M.; Fridrichova, M.; Urbaskova, P.; Zemlickova, H., Regional Spread of *Pseudomonas aeruginosa* ST357 Producing IMP-7 Metallo-beta-Lactamase in Central Europe. *Journal of Clinical Microbiology* **2011**, *49* (1), 474-475.
38. Miyoshi-Akiyama, T.; Tada, T.; Ohmagari, N.; Nguyen Viet, H.; Tharavichitkul, P.; Pokhrel, B. M.; Gniadkowski, M.; Shimojima, M.; Kirikae, T., Emergence and Spread of Epidemic Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Biology and Evolution* **2017**, *9* (12), 3238-3245.
39. Xiang, D.-R.; Li, J.-J.; Sheng, Z.-K.; Yu, H.-Y.; Deng, M.; Bi, S.; Hu, F.-S.; Chen, W.; Xue, X.-W.; Zhou, Z.-B.; Doi, Y.; Sheng, J.-F.; Li, L.-J., Complete Sequence of a Novel IncR-F33:A-B- Plasmid, pKP1034, Harboring fosA3, bla(KPC-2), bla(CTX-M-65), bla(SHV-12), and rmtB from an Epidemic *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 11 Strain in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2016**, *60* (3), 1343-1348.
40. Ageevets, V.; Sopova, J.; Lazareva, I.; Malakhova, M.; Ilina, E.; Kostryukova, E.; Babenko, V.; Carattoli, A.; Lobzin, Y.; Uskov, A.; Sidorenko, S., Genetic Environment of the bla(KPC-2) Gene in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate That May Have Been Imported to Russia from Southeast Asia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2017**, *61* (2).

## 10 Curriculum vitæ

Jméno	<b>Mgr. Kateřina Chudějová</b>
Datum a místo narození	09.12.1989, Vsetín
Adresa	Elišky Krásnohorské 741/22, 323 00 Plzeň
Současná pozice	Od r. 2018 Jiný odborný pracovník v laboratorních metodách, Ústav mikrobiologie, FN Plzeň Od r. 2014 Ph.D. student – Biomedicínské centrum Lékařské fakulty v Plzni, Univerzita Karlova
Adresa zaměstnavatele	Alej Svobody 76, 323 00 Plzeň
Vzdělání	2012–2014 Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova; obor: <i>Zdravotnická bioanalytika – Odborný pracovník v laboratorních metodách</i> 2009–2012 Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova; obor: <i>Zdravotnická bioanalytika – Zdravotní laborant</i> 2005–2009 Střední zdravotnická škola a Vyšší odborná škola zdravotnická Brno; obor: <i>laboratorní asistent</i>
Jazykové znalosti	Český jazyk – rodný Anglický jazyk – B1 - B2 Španělský jazyk – A2 Německý jazyk – pasivní
Technické dovednosti	Mikrobiologie: Praxe v mikrobiologických metodách. Izolace, identifikace bakterií (zejména <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.); molekulárně-genetická diagnostika bakterií, molekulární epidemiologie. Molekulární biologie: Zkušenosti s technikami molekulární biologie, např., PCR, real-time kvantitativní PCR, RT-PCR a odvozené metody pro amplifikaci DNA, DNA sekvenace, Southern blotting, hybridizace, transformace, konjugace, PFGE, MLST. Analýza proteinů: Izoelektrická fokuzace, techniky MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.
H-Index	3 (25.06.2018, Scopus)
Počet citací (bez autocitací)	26 (25.06.2018, Scopus)
Počet publikací v časopisech s IF	11
Publikace	viz Seznam publikací
Jiné práce	<b>Absolventské práce:</b> Citlivost multirezistentních kmenů k dezinfekčním prostředkům – <i>diplomová práce</i> Klinickobiochemická diagnostika hypothyreos – <i>bakalářská práce</i>

### Prezentace:

- 2015 - Tomáškovy dny mladých mikrobiologů – téma: Vývoj rychlé diagnostické metody na principu MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie pro zjištění rezistence ke kolistinu u gramnegativních bakterií (Chudějová K, Skálová A, Papagiannitsis C. C, Hrabák J)
- 2015 - Mladí mikrobiologové – rezistence na antibiotika, nefermentující tyčinky, ČLS JEP – téma: Vývoj rychlé diagnostické metody na principu MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie pro zjištění rezistence ke kolistinu u gramnegativních bakterií (Chudějová K, Skálová A, Papagiannitsis C. C, Hrabák J)
- 2015 - Studentská vědecká konference – téma: Vývoj rychlé diagnostické metody na principu MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie pro zjištění rezistence ke kolistinu u gramnegativních bakterií (Chudějová K, Skálová A, Papagiannitsis C. C, Hrabák J)
- 2016 - Mladí mikrobiologové – nové diagnostické metody, ČLS JEP – téma: Rezistence ke kolistinu a její mikrobiologická detekce (Chudějová K, Skalova A, Rotova V, Papagiannitsis C. C, Hrabák J)
- 2017 - Studentská vědecká konference – téma: Automatická depozice izolátů bakterií a hub na MALDI destičku za použití robotu MALDI Colonyst (Chudějová K, Skálová A, Rotová V, Papagiannitsis C. C, Boháč M, Králová D, Hrabák J, Bergerová T)
- 2018 - Studentská vědecká konference – téma: Charakterizace KPC-kódujícího plasmidu u *Enterobacteriaceae* ve FN Hradec Králové (Chudějová K, Kukla R, Papagiannitsis C. C, Medvecký M, Habalová K, Hobzová L, Bolehovská R, Plíšková L, Hrabák J, Žemličková H)
- 2018 - Angelini University Award – Boj proti antibiotické rezistenci – téma: Vývoj rychlých testů pro detekci nejzávažnějších mechanismů antibiotické rezistence (Chudějová K, Skálová A, Pašková V, Hrabák J)

### Postery:

- European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2018*
- Poster – Characterization of KPC-encoding plasmids from *Enterobacteriaceae* in a Czech hospital (Chudejova K, Kukla R, Papagiannitsis C. C, Medvecký M, Habalova K, Hobzova L, Bolehovska R, Pliskova L, Hrabak J, Zemlickova H)
- Poster – Characterization of NDM-like-producing *Enterobacteriaceae* isolated in Czech hospitals (Rotova V, Bitar I, Medvecký M, Skalova A, Chudejova K, Jakubu V, Bergerova T, Zemlickova H, Papagiannitsis C. C, Hrabak J)

*European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2017*

ePoster – Evaluation and validation of newly developed spectrophotometric HRC assay for detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* (Rotova V, Papagiannitsis C. C, Skalova A, Chudejova K, Hrabak J)

Poster – Molecular characterization of M $\beta$ L-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Czech hospitals (Papagiannitsis C. C, Chudejova K, Medvecký M, Skalova A, Rotova V, Jakubu V, Zemlickova H, Hrabak J)

Poster – Automatic deposition of bacteria and yeast on MALDI target using MALDI Colony robot (Chudejova K, Hrabak J, Rotova V, Papagiannitsis C. C, Bohac M, Skalova A, Bergerova T)

Molecular-epidemiological characteristics of antituberculous-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates identified in West Bohemian region of the Czech Republic (Amlerova J, Kralova D, Chudejova K, Hrabak J)

*European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2016*

ePoster – Molecular epidemiological analysis of OXA-48 producing *Enterobacteriaceae* in the Czech Republic with an evidence of horizontal gene transfer (Skalova A, Chudejova K, Rotova V, Bergerova T, Jakubu V, Zemlickova H, Papagiannitsis C. C, Hrabak J)

poster – Complete nucleotide sequences of three IncA/C<sub>2</sub>-type plasmids carrying In416-like integrons with *bla*<sub>VIM</sub> genes from *Enterobacteriaceae* isolates of Greek origin (Papagiannitsis C. C, Dolejska M, Izdebski R, Giakkoupi P, Skalova A, Chudejova K, Dobiasova H, Vatopoulos A, Derde L. P. G, Bonten M. J, Gniadkowski M, Hrabak J)

## 11 Seznam publikací

Publikace	Impact Factor (Web of Science)	Počet citací (Web of Science, 25.06.2018)	Počet citací (Scopus, 25.06.2018)
Paskova, V, Medvecký, M, Skalova, A, <b>Chudejova, K</b> , Bitar, I, Jakubu, V, Bergerova, T, Zemlickova, H, Papagiannitsis, C.C, and Hrabak, J. "Characterization of NDM encoding plasmids from <i>Enterobacteriaceae</i> recovered from Czech hospitals" <i>Frontiers in Microbiology</i> (2018): <b>V tisku</b>	4.076	-	-
Jamborova, I, Johnston, B, Papousek, I, Kachlikova, K, Micenkova, L, Clabots, C, Skalova, A, <b>Chudejova, K</b> , Dolejska, M, Literak, I, and Johnson, J. "Extensive genetic commonality among wildlife, wastewater, community, and nosocomial isolates of <i>Escherichia coli</i> sequence type 131 ( <i>H30R1</i> and <i>H30Rx</i> subclones) That Carry <i>bla<sub>CTX-M-27</sub></i> or <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> " <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> (2018): <b>V tisku</b>	4.302	-	-
Papagiannitsis, C.C, Paskova, V, <b>Chudejova, K</b> , Medvecký, M, bitar, I, Jakubu, V, Zemlickova, H, Jirsa, R, and Hrabak, J. "Characterization of pEncl-30969cz, a novel ColE1-like plasmid encoding VIM-1 carbapenemase, from an <i>Enterobacter cloacae</i> sequence type 92 isolate." <i>Diagnostic Microbiology and Infectious Disease</i> 91.2 (2018): 191-193. doi: <a href="https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.024">10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.024</a> .	2.401	0	0
Kukla, R*, <b>Chudejova, K*</b> , Papagiannitsis, C.C, Medvecký, M, Habalova, K, Hobzova, L, Bolehovska, R, Pliskova, L, Hrabak, J, and Zemlickova, H. "Characterization of KPC-encoding plasmids from <i>Enterobacteriaceae</i> isolated in a Czech hospital." <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> 62.3 (2018): e02152-17. doi: <a href="https://doi.org/10.1128/AAC.02152-17">10.1128/AAC.02152-17</a> .	4.302	0	0
<b>Chudejova, K</b> , Paskova, V, Skalova, A, Medvecký, M, Adamkova, V, Papagiannitsis, C.C, and Hrabak, J. "Emergence of sequence type 252 <i>Enterobacter cloacae</i> producing GES-5 carbapenemase in a Czech hospital." <i>Diagnostic Microbiology and Infectious Disease</i> 90.2 (2018): 148-150. doi: <a href="https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.10.011">10.1016/j.diagmicrobio.2017.10.011</a> .	2.401	0	0
<b>Chudejova, K</b> , Bohac, M, Skalova, A, Paskova, V, Papagiannitsis, C.C, Hanzlickova, J, Bergerova, T, and Hrabak, J. "Validation of a novel automatic deposition of bacteria and yeasts on MALDI target for MALDI-TOF MS-based identification using MALDI Colony robot." <i>PLoS One</i> 12.12 (2017): e0190038. doi: <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190038">10.1371/journal.pone.0190038</a> .	2.806	0	0

<b>Publikace</b>	Impact Factor (Web of Science)	Počet citací (Web of Science, 25.06.2018)	Počet citací (Scopus, 25.06.2018)
Paskova, V, Papagiannitsis, C.C, <b>Chudejova, K</b> , Medvecký, M, Skalova, A, Adamkova, V, and Hrabak, J. "First description of the emergence of <i>Enterobacter asburiae</i> producing IMI-2 carbapenemase in the Czech Republic." <i>Journal of Global Antimicrobial Resistance</i> 11 (2017): 98. doi: <a href="https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.001">10.1016/j.jgar.2017.10.001</a> .	1.276	0	0
Papagiannitsis, C.C, Medvecký, M, <b>Chudejova, K</b> , Skalova, A, Paskova, V, Spanelova, P, Jakubu, V, Zemlickova, H, and Hrabak, J. "Molecular Characterization of Carbapenemase-Producing <i>Pseudomonas aeruginosa</i> of Czech Origin and Evidence for Clonal Spread of Extensively Resistant Sequence Type 357 Expressing IMP-7 Metallo-β-Lactamase." <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> 61.12 (2017): e01811-17. doi: <a href="https://doi.org/10.1128/AAC.01811-17">10.1128/AAC.01811-17</a> .	4.302	0	1
Paskova, V, Papagiannitsis, C.C, Skalova, A, <b>Chudejova, K</b> , and Hrabak, J. "Comparison of imipenem and meropenem antibiotics for the MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity." <i>Journal of Microbiological Methods</i> 137 (2017): 30-33. doi: <a href="https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.04.003">10.1016/j.mimet.2017.04.003</a> .	1.790	6	7
Skalova, A, <b>Chudejova, K</b> , Paskova, V, Medvecký, M, Studentova, V, Chudackova, E, Lavicka, P., Bergerova, T, Jakubu, V, Zemlickova, H, Papagiannitsis, C.C, and Hrabak, J. "Molecular characterization of OXA-48-like-producing <i>Enterobacteriaceae</i> in the Czech Republic and evidence for horizontal transfer of pOXA-48-like plasmids." <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> 61.2 (2017): e01889-16. doi: <a href="https://doi.org/10.1128/AAC.01889-16">10.1128/AAC.01889-16</a> .	4.302	7	12
Papagiannitsis, C.C, Dolejska, M, Izdebski, R, Giakkoupi, P, Skalova, A, <b>Chudejova, K</b> , Dobiasova, H, Vatopoulos, A.C, Derde, L.P.G, Bonten, M.J.M, Gniadkowski, M, and Hrabak, J. "Characterisation of IncA/C2 plasmids carrying an In416-like integron with the blaVIM-19 gene from <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST383 of Greek origin." <i>International Journal of Antimicrobial Agents</i> 47.2 (2016): 158-162. doi: <a href="https://doi.org/10.1093/jac/dkv304">10.1093/jac/dkv304</a> .	4.307	6	6

\* R.K. and K.CH. v této práci přispěli stejným dílem